

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Anita Brožková**

**Transkripční regulace genů *GAL* – model pro studium funkce chromatinu**

**Transcriptional regulation of *GAL* genes – model for chromatin structure study**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Praha, 2013

Zde bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu bakalářské práce, Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc, za jeho čas, odborné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martině Hálové, RNDr. Anně Valentové a ostatním kolegům z laboratoře za jejich ochotu a pomoc. Poděkování patří též mé rodině za trpělivost a podporu při psaní této práce.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 05. 2013

Podpis

## **Abstrakt**

Genový systém *GAL* kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* umožňuje této jednobuněčné houbě metabolizovat monosacharid galaktózu. Exprese genů *GAL* je řízena regulační kaskádou, kde k aktivaci transkripce dochází v přítomnosti galaktózy a k represí v přítomnosti glukózy. Systém *GAL* se již desítky let uplatňuje jako model pro studium transkripční regulace u eukaryot. Produkty genů *GAL* se dělí na enzymy zabezpečující vlastní metabolismus galaktózy a specifické regulační proteiny. Při studiu genů *GAL* byla například zjištěna pozoruhodná okolnost, že gen pro jeden z hlavních regulačních proteinů a gen kódující enzym galaktokinázu se patrně vyvinuly v důsledku dávné genové duplikace jejich společného předka a v průběhu evoluce nabyly rozdílných funkcí.

Geny *GAL* dále představují modelový systém pro studium změn chromatinu doprovázející aktivaci a represí transkripce. Další poměrně nedávno objevený mechanismus regulace systému *GAL* představuje represe transkripce genů *GAL1* a *GAL10* prostřednictvím ncRNA, která byla objevena v souvislosti ze změnou rozložení methylace na lokusu *GAL10*. Zřejmě nejnovějším objevem regulace genové exprese genů *GAL* je změna jaderné lokalizace klastru *GAL1,-7,-10* v důsledku změny dostupnosti zdroje uhlíku. Genový systém *GAL* kvasinky *S. cerevisiae* je dobrou ilustrací toho, jak rozmanitých podob může genová regulace eukaryot nabývat.

**Klíčová slova:** geny *GAL*, galaktóza, *Saccharomyces cerevisiae*, regulace, transkripce, ncRNA, chromatin

## **Abstract**

The *GAL* system in *Saccharomyces cerevisiae* enables this budding yeast to metabolize galactose. Expression of *GAL* genes is controlled by a regulatory cascade in which galactose triggers the activation of *GAL* gene expression, whereas glucose acts as a repressor. *GAL* genes in yeast have been used for decades as a model system for transcription regulation in eucaryotes. The products of *GAL* genes are *GAL* regulatory and *GAL* structural genes. Intriguingly, during studies of the *GAL* system it has been discovered that one of the regulatory genes and the structural gene for the galactokinase enzyme are apparently related. It has been suggested that an ancestor of the two genes underwent a gene duplication event which allowed the paralogs to gain different functions.

The *GAL* genes serve as a model system for the study of chromatin changes during transcription activation or repression. Transcriptional repression of *GAL1* and *GAL10* genes via ncRNA represents one of the recently discovered regulatory mechanisms of the *GAL* system. This mechanism has been discovered due to the changes in the histone methylation pattern across the *GAL10* locus. However, the latest discovery in *GAL* gene regulation has probably been the role of nuclear localization of the *GAL1,-7,-10* cluster in response to changes of carbon sources. *GAL* genes demonstrate how diverse and variable eucaryotic regulation can be.

**Key words:** *GAL* genes, galactose, *Saccharomyces cerevisiae*, regulation, transcription, ncRNA, chromatin

## Seznam zkratek

ATP .....	Adenosin trifosfát
COMPASS .....	<b>COM</b> plex of <b>P</b> roteins <b>AS</b> sociated with <b>Set</b> 1
EMSA .....	Electrophoretic <b>M</b> obility <b>S</b> hift <b>A</b> ssay (mobilní elektroforéza)
FRET .....	<b>F</b> luorescence <b>R</b> esonance <b>E</b> nergy <b>T</b> ransfer
galaktóza-1-P .....	galaktóza-1-fosfát
glukóza-1-P .....	glukóza-1-fosfát
glukóza-6-P .....	glukóza-6-fosfát
H3K36me.....	methylace histonu H3 na lyzinu 36
H3K4me .....	methylace histonu H3 na lyzinu 4
HAT .....	<b>H</b> istone <b>a</b> cetyltransferase (acetyltransferáza histonů)
HDAC .....	<b>H</b> istone <b>d</b> eacetylase (deacetyláza histonů)
ChIP .....	<b>C</b> hromatin <b>i</b> mmuno- <b>p</b> recipitation (chromatinová imunoprecipitace)
mRNA .....	<b>m</b> essenger <b>R</b> NA (mediátorová RNA)
ncRNA .....	<b>n</b> on-coding <b>R</b> NA (nekódující RNA)
NFR .....	<b>N</b> ucleosome- <b>F</b> ree <b>R</b> egion (oblast neobsahující nukleozómy)
ORF .....	<b>O</b> pen <b>R</b> eadin <b>G</b> <b>F</b> rame (otevřený čtecí rámec)
RSC .....	<b>R</b> emodel the <b>S</b> tructure of <b>C</b> hromatin
SAGA .....	<b>S</b> pt- <b>A</b> da- <b>G</b> cn5 <b>A</b> cetyltransferase
TBP .....	<b>T</b> ATA <b>B</b> inding <b>P</b> rotein (protein vážící TATA box)
UAS <sub>G</sub> .....	<b>U</b> pstream <b>A</b> ctivation <b>S</b> equ <b>en</b> ce of <b>G</b> AL (upstream aktivační sekvence genů <b>G</b> AL)
UDP-glukóza .....	Uridin difosfát glukóza
URS <sub>G</sub> .....	<b>U</b> pstream <b>R</b> epression <b>S</b> equ <b>en</b> ce of <b>G</b> AL genes

1	Úvod .....	5
2	Metabolismus galaktózy v <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
2.1	Základní metabolická dráha .....	6
2.2	Efektorové proteiny a jejich geny.....	7
3	Regulace metabolismu galaktózy v <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
3.1	Základní principy regulace.....	9
3.2	Regulační kaskáda genů <i>GAL</i> .....	11
3.3	Základní stavy systému <i>GAL</i> a jeho regulátory.....	12
3.3.1	Represe.....	13
3.3.2	Preindukce:.....	14
3.3.3	Aktivace (indukce) .....	14
3.3.4	Modely molekulárních mechanismů aktivace transkripce genů <i>GAL</i> .....	15
4	Chromatin a jeho role v regulaci exprese systému <i>GAL</i> .....	18
4.1	Struktura chromatinu .....	18
4.2	Chromatinové remodelační a histonové modifikační komplexy.....	19
4.2.1	Komplex Swi/Snf a komplex RSC .....	20
4.2.2	Komplex SAGA.....	20
4.2.3	Rpd3p .....	21
4.3	Změna struktury nukleozomů v oblasti genů <i>GAL1</i> , <i>-10</i> po indukci galaktózou .....	22
4.4	Role nekódující RNA v regulaci transkripce genů <i>GAL</i> .....	24
4.4.1	Souvislost methylace histonů v oblasti genů <i>GAL1</i> , <i>GAL10</i> a přítomnosti ncRNA .....	25
4.5	Role jaderné lokalizace v regulaci genové exprese.....	28
5	Závěr.....	30
6	Přehled použité literatury .....	31

# 1 Úvod

Schopnost rozpoznat změny v okolním prostředí a dokázat se jim přizpůsobit představuje nutnost pro přežití každého živého organismu. Nemá-li buňka k dispozici zdroj uhlíku, který by mohl být metabolizován a energeticky zúročen, dříve nebo později uhyne. Organismy se z tohoto důvodu v průběhu evoluce adaptovaly k využívání různých zdrojů uhlíku ve svém okolí. Tyto metabolické adaptace byly podmíněny vývojem příslušné genetické výbavy a společně s ní i vývojem mechanismů regulace genové exprese. Dobrým příkladem takovéto adaptace a zároveň vhodným modelovým organismem pro studium regulace genové exprese je jednobuněčná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, proto bude v mé práci sloužit coby model pro objasnění této problematiky.

Jednobuněčná kvasinka *S. cerevisiae* patří do skupiny hub (*Fungi*); poprvé byla izolována pravděpodobně z biofilmu slupek hroznů vinné révy. Hlavním zdrojem uhlíku pro tuto kvasinku bývají monosacharidy či oligosacharidy, které enzymaticky štěpí na glukózu. Monosacharid glukóza představuje pro kvasinku *S. cerevisiae* preferenční a energeticky nejvýhodnější zdroj uhlíku. Jestliže *S. cerevisiae* roste v prostředí s dostatkem živin, získává energii převážně prostřednictvím fermentace glukózy na etanol v glykolytické dráze. Jsou-li v okolí k dispozici jiné monosacharidy než glukóza, například galaktóza, je ji tato kvasinka schopna metabolizovat na glukózu a začlenit do glykolytické dráhy (Broach et al., 1979). Přeměna galaktózy na glukózu se uskutečňuje prostřednictvím produktů genů galaktózového metabolismu, které se souhrnně nazývají geny *GAL*. Tyto geny podléhají regulačním mechanismům zabráňujícím jejich expresi v podmínkách, kdy galaktóza není dostupná, naopak aktivace jejich exprese závisí na přítomnosti galaktózy (DeVit et al., 1997).

Genový systém *GAL* slouží již desítky let jako klíčový model pro studium transkripční regulace u eukaryot. Využití tohoto systému v základním výzkumu má nadále svůj podstatný význam, systém *GAL* se využívá například ke studiu role nekódující RNA či vlivu jaderné lokalizace genů na regulaci genové exprese. Ve své práci bych se chtěla zaměřit nejen na již delší dobu známé mechanismy regulace tohoto systému, ale i na poměrně nově objevené poznatky o regulaci genů *GAL*.

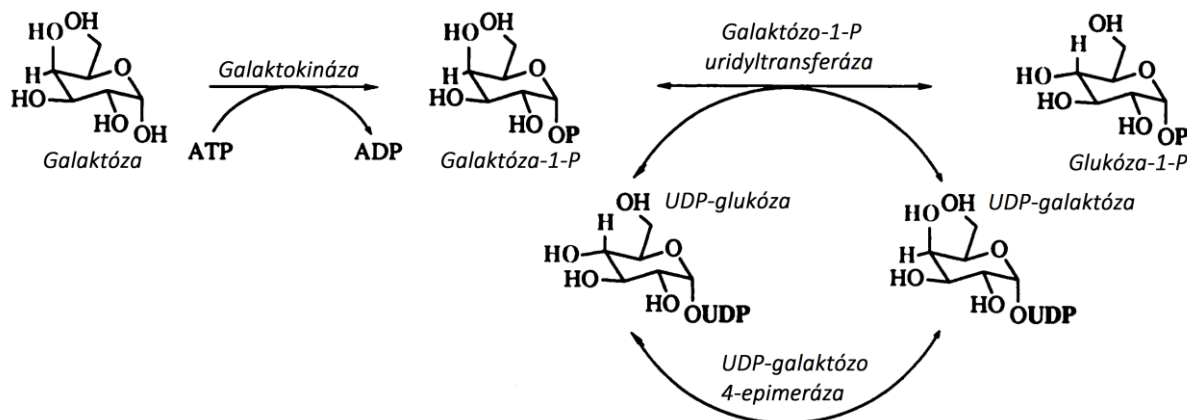
## 2 Metabolismus galaktózy v *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.1 Základní metabolická dráha

Monosacharid galaktóza je epimerem glukózy, který se v přírodě vyskytuje nejčastěji ve formě mléčného cukru laktózy. Metabolismus galaktózy byl popsán v letech 1948 až 1951 biochemikem Luisem Fredericem Leloiorem a jeho skupinou. Jedná se o sled tří enzymatických reakcí, které se na počest svého objevitele nazývají Leloirova dráha (Obr. 1.). Cílem reakcí Leloirovy dráhy je přeměna galaktózy na glukózu-6-fosfát (dále glukózu-6-P), která představuje vstupní substrát glykolytické dráhy. Prvním krokem Leloirovy dráhy je galaktokinázová reakce, v níž dochází k fosforylaci  $\alpha$ -D-galaktózy na galaktózu-1-fosfát (dále galaktóza-1-P) za účasti ATP. V následující reakci podstupuje galaktóza-1-P reakci, které se účastní uridin difosfát glukóza (dále UDP-glukóza). Objev UDP-glukózy při výzkumu metabolismu galaktózy představoval vůbec první objev komplexu nukleotidu a cukru. Za účasti enzymu uridyltransferázy dochází k přenosu galaktózové skupiny na skupinu uridin difosfátu a současného vzniku glukózy-1-P. UDP-galaktóza následně podstupuje přeměnění na UDP-glukózu v epimerázové reakci. V aktivním centru epimerázy galaktózy, obsahujícím kofaktor  $\text{NAD}^+$ , dochází k redoxním reakcím přeměňujícím UDP-hexózu z galaktózové na glukózovou konfiguraci. Jak reakce uridyltransferázy, tak reakce epimerázy galaktózy, představují reakce zvrtné. V nižších koncentracích galaktózy v buňce tedy slouží reakce Leloirovy dráhy k syntéze UDP-galaktózy (shrnutí ve Frey et al., 1996).

Evoluce tří enzymů pro katalýzu jedné konfigurační změny se zdá být unikátním fenoménem charakteristickým pro metabolismus galaktózy. Přeměna jednoho molu galaktózy na jeden mol glukózy-1-P vyžaduje energii odpovídající jednomu molu ATP. V přítomnosti  $\beta$ -anomeru galaktózy předchází vstupu do centrální Leloirovy dráhy mutarotace  $\beta$ -anomeru na  $\alpha$ -anomer katalyzovaná specifickou mutarotázou. Produktem Leloirovy dráhy je glukóza-1-P, která je před svým vstupem do glykolytické dráhy přeměněna ve fosfoglukomutázové reakci na glukózu-6-P (shrnutí ve Frey et al., 1996).





Obr. 1. Schéma Leloirový dráhy; převzato a upraveno z Frey et al., 1996

## 2.2 Efektorové proteiny a jejich geny

Metabolismus galaktózy se uskutečňuje prostřednictvím efektorových proteinů kódovaných geny *GAL*, mezi něž se obvykle řadí *GAL2*, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL5* a *MEL1* (Tab. 1.). Produkty těchto genů zabezpečují transport galaktózy do buňky a její přeměnu na glukózu-1-P (Obr. 2.) (shrnutí v Lohr et al., 1995).

Tab. 1. Efektorové geny *GAL* a jejich genové produkty

Gen	Protein	Aktivita – funkce
<i>GAL2</i>	Gal2p	Permeáza galaktózy – transport galaktózy do buňky
<i>GAL1</i>	Gal1p	Galaktokináza – fosforylace galaktózy na galaktózu-1-P
<i>GAL7</i>	Gal7p	Galaktóza-1-P uridylyltransferáza – přenos uridylové skupiny na galaktózu-1-P
<i>GAL10</i>	Gal10p	Galaktóza epimeráza – epimerace galaktosylové skupiny na glukosylovou
<i>GAL5</i>	Gal5p	Fosfoglukomutáza – přeměna glukózy-1-P na glukózu-6-P
<i>MEL1</i>	Mel1p	$\alpha$ -galaktozidáza – štěpení melibiózy na galaktózu a glukózu

Kvasinka *S. cerevisiae* je schopna příjmu galaktózy i ve formě disacharidu melibiózy, a to díky genovému produktu *MEL1*, který kóduje  $\alpha$ -galaktozidázu sekretovanou z buňky do vnějšího prostředí. Mel1p štěpí melibiózu na monosacharidy galaktózu a glukózu, které je buňka schopna přijímat a dále metabolizovat.

Gen *GAL2* se u kvasinky *S. cerevisiae* nachází na chromozomu XII; kóduje permeázu galaktózy, což je transmembránový protein zajišťující vysokoafinitní transport galaktózy do buňky (Ramos et al., 1989; shrnuto v Johnston et al., 1987). Permeáza galaktózy Gal2p patří do rodiny glukózových transporterů Glut (Henderson et al., 1993). Jedná se o transmembránový protein tvořený 575 aminokyselinami s dvanácti hydrofóbními  $\alpha$ -helixy, které ukotvují Gal2p v membráně. Bylo prokázáno, že Gal2p dokáže transportovat glukózu stejně jako galaktózu (Nishizawa et al., 1995), navíc vykazuje strukturní podobnost s glukózovým transporterem Hxt2p (Kruckeberg a Bisson, 1990). Permeáza Gal2p je však v přítomnosti glukózy endocytována a proteolyticky degradována (Horák a Wolf, 1997; Ramos a Cirillo, 1989).

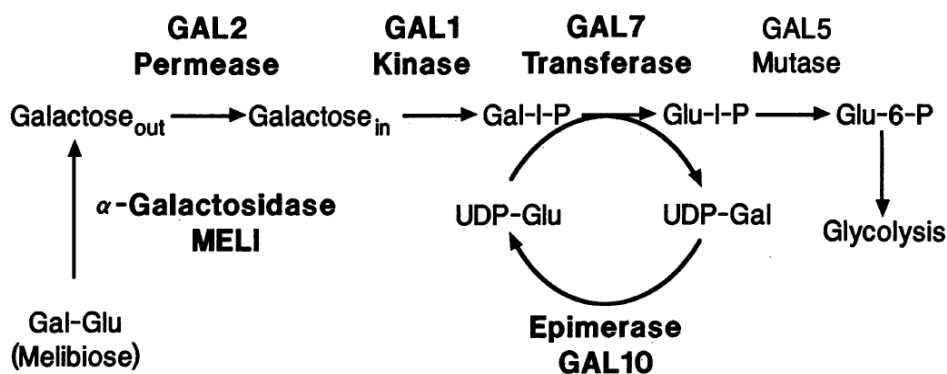
Galaktóza je po svém vstupu do buňky přeměňována na glukózu-1-P enzymy Leloiroy dráhy kódovanými geny *GAL1*, *GAL7* a *GAL10*. Tyto geny tvoří klastr lokalizovaný poblíž centromerické oblasti na chromosomu II (shrnutu v Johnston et al., 1987), všechny tři genové produkty těchto genů představují cytoplasmatické proteiny (Christacos et al., 2000). Galaktokináza, Gal1p, představuje enzym o velikosti 43 000 Da vykazující katalytickou aktivitu ve formě monomeru. Kromě galaktokinázové aktivity má Gal1p též slabou regulační aktivitu ovlivňující ostatní geny galaktózového metabolismu a jeho nadprodukcí lze kompenzovat deficienci regulačního proteinu Gal3p (Bhat et al., 1990).

Galaktóza-1-P-uridylyltransferáza je vysoce konzervovaný enzym od bakterie *E. coli* až po člověka (Seiboth et al., 2002). Mutace v lidském ortologu *GAL7*, *GALT*, způsobuje potenciálně smrtelnou nemoc zvanou galaktosémie (Riehm et al., 2001).

Epimeráza galaktózy Gal10p představuje ústřední enzym Leloiroy dráhy katalyzující konverzi UDP-galaktózy na UDP-glukózu, stejně tak slouží buňce k *de novo* syntéze galaktózy z UDP-glukózy. Funkční holoenzymy Gal7p i Gal10p sestávají ze dvou podjednotek. Protein Gal10p má ze všech tří enzymů Leloiroy dráhy nejvyšší molekulovou hmotnost, která činí 91 500 Da, poměr koncentrací Gal10p : Gal7p : Gal1p činí přibližně 1 : 1 : 4 (Fukasawa et al., 1979).

Všechny výše uvedené geny vykazují závislost hladiny exprese na přítomnosti galaktózy; je-li galaktóza jediným zdrojem uhlíku, vzrůstá hladina exprese genů *GAL1*, *-7*, *-10* a *GAL2* až na tisícinásobek hladiny exprese za nepřítomnosti galaktózy (Johnston a Davis, 1984). Obdobnou závislost lze pozorovat i u genu *MEL1*, jehož exprese v přítomnosti galaktózy dosahuje přibližně stonásobné hladiny exprese v přítomnosti glukózy (shrnutí v Lohr et al., 1995).

Gen *GAL5*, neboli *PGM2*, bývá též řazen mezi efektorové geny *GAL*, kódující hlavní isozym<sup>1</sup> fosfoglukomutázy přeměňující glukózu-1-P na glukózu-6-P. *GAL5* podléhá stejným regulačním mechanismům charakteristickým pro ostatní efektorové geny *GAL*, oproti nim však vykazuje nezvykle vysokou, na galaktóze nezávislou, hladinu exprese. Při plné aktivaci galaktózou se exprese *GAL5* zvyšuje přibližně třikrát oproti expresi v přítomnosti glukózy (Oh and Hopper, 1990).



Obr. 2. Schéma příjmu a metabolismu galaktózy v buňce; převzato z Johnston et al., 1987

### 3 Regulace metabolismu galaktózy v *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1 Základní principy regulace

Jednou z klíčových vlastností každé buňky je schopnost přijímat informace o změnách v okolním prostředí a adekvátně se jim přizpůsobit. K přenosu signálu o změnách v prostředí dochází za pomoci funkčně specifických proteinů, jejichž úkolem je zprostředkovat signální kaskádu vedoucí až k výsledné změně genové exprese. Uvažujeme-li konkrétně změny

<sup>1</sup> Fosfoglukomutáza je u kvasinky *S. cerevisiae* kódována třemi geny, *PGM1* na chromozomu XI, *PGM2* (*GAL5*) a *PGM3* na chromozomu XIII (podle: [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org))

dostupnosti živin, změnou exprese se zpravidla miní takzvané „přepnutí metabolismu“ (metabolic switch) obnášející aktivaci syntézy enzymů pro metabolismus nového substrátu. Význam regulace genové exprese spočívá v možnosti rychlé reakce na změny dostupnosti živin odehrávající se na úrovni syntézy mRNA.

Pro buňku je z energetických důvodů žádoucí exprimovat geny pro metabolismus konkrétního substrátu pouze v jeho přítomnosti. Genový systém *GAL* podléhá též přísné regulaci závislé na přítomnosti galaktózy v okolí. Důvodem striktní regulace celého systému *GAL* je skutečnost, že hladina exprese genů *GAL* u kvasinky *S. cerevisiae* může v plně indukovaném stavu dosahovat extrémně vysokých hodnot<sup>2</sup>. Kdyby nebyl přítomen regulační mechanismus zabraňující expresi v nepřítomnosti galaktózy, docházelo by k velkým energetickým ztrátám vynaloženým na údržbu pro buňku nepotřebných proteinů. Genetická výbava kvasinky *S. cerevisiae* proto obsahuje řadu regulačních genů, které kódují enzymy pro efektivní represi genového systému *GAL* za podmínek, kdy není galaktóza přítomna.

Již v 60. letech minulého století byl Douglasem a Hawthornem postulován model regulace systému *GAL*, který byl částečně založen na operonovém modelu Jacoba a Monoda. K vyslovení této hypotézy vedla v některých aspektech nápadná podobnost kvasinkového systému *GAL* s *lac* operonem bakterie *E.coli*. Regulace laktóзовého operonu probíhá následovně: Nemá-li tato bakterie k dispozici laktózu, váže se *lac* represor na laktózový operátor<sup>3</sup> a zabraňuje expresi genů pro metabolismus laktózy. Zároveň v případě *lac* operonu dochází ke katabolické represi zprostředkované glukózou. Obdobně jako v *E.coli* dochází i v kvasince *S. cerevisiae* ke katabolické represi v přítomnosti glukózy, avšak za přítomnosti galaktózy s glukózou udržuje kvasinka, na rozdíl od bakterie, určitou hladinu exprese genů *GAL*<sup>4</sup> (Adams et al., 1972). V původním Douglas-Hawthornově modelu figuroval Gal80p coby represor vážící se na operátor genu *GAL4* (Hopper a Rowe, 1978). Ačkoli je dnes tato myšlenka překonána, stála na počátku objasnění principů regulace metabolismu galaktózy.

---

<sup>2</sup> Hladina exprese *GAL1*, *GAL10* a *GAL7* může tvořit 0,25 až 1% celkové polyadenylované mRNA (Webster and Dickson, 1988)

<sup>3</sup> zde úsek DNA na nějž se váže represor

<sup>4</sup> Hladina exprese *GAL1* se v přítomnosti 2% galaktózy a 0,5% glukózy pohybuje okolo 42% hladiny exprese v přítomnosti galaktózy (Adams et al., 1972)

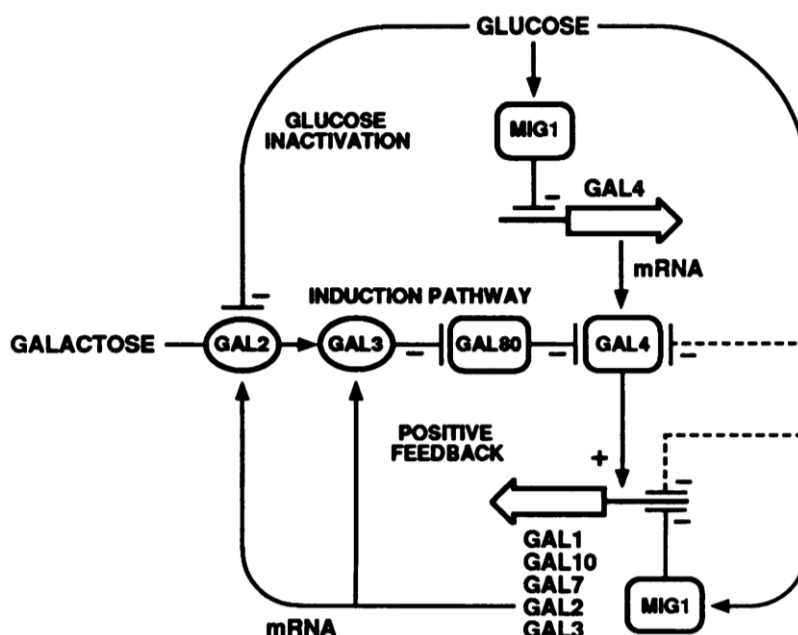
### 3.2 Regulační kaskáda genů *GAL*

Exprese genů *GAL* je řízena regulační kaskádou (Obr. 3.), ve které plní hlavní funkce tři základní regulační proteiny systému *GAL* (Gal3p, Gal4p, Gal80p). Exprese regulačních genů, stejně jako buněčná lokalizace proteinových produktů, je ovlivňována přítomností galaktózy v prostředí (Lohr a Lopez, 1995; DeVit et al., 1997). Po vstupu galaktózy do buňky, prostřednictvím permeázy Gal2p, dochází k transdukci signálu pomocí proteinu Gal3p (Broach et al., 1979; Platt a Reece, 1998). Tento protein je nezbytný pro rychlou indukci galaktózou regulovaných genů; v přítomnosti Gal3p nastává plná aktivace exprese efektorových genů *GAL* během několika minut, avšak bez Gal3p dochází ke zpoždění aktivace o 3 až 5 dní (Bhat et al., 1990; Bajawa et al., 1988, Torchia a Hopper, 1986).

Pozoruhodnou okolností je, že geny *GAL1* a *GAL3* představují patrně paralogní geny, které evolučně vznikly genovou duplikací. Produkt genu *GAL1* si zachoval svou metabolickou aktivitu, zatímco *GAL3* získal regulační funkci. Této hypotéze nasvědčuje vysoká strukturní i sekvenční podobnost proteinů Gal1p s Gal3p, které se shodují ze 70 % ve své struktuře a z 90 % v aminokyselinové sekvenci (Shell a Wilson, 1976; Timson a Reece, 2002). Navíc oba tyto proteiny vyžadují ke své funkci galaktózu i ATP; Gal1p ke katalýze galaktokinázové reakce a Gal3p k fyzické interakci s Gal80p (Zenke et al., 1996). Protein Gal3p sice nevykazuje galaktokinázovou aktivitu, avšak zařazení pouhých dvou aminokyselin proteinu Gal1p do shodného místa na Gal3p má za následek schopnost Gal3p katalyzovat galaktokinázovou reakci (Platt et al., 2000). Pro platnost hypotézy o paralogii genů *GAL1* a *GAL3* *Saccharomyces cerevisiae* hovoří i studie prováděné na evolučně příbuzné mléčné kvasince *Kluyveromyces lactis*. Galaktokináza *K. lactis* má kromě katalytické aktivity zároveň funkci regulační, která je obdobná k regulační funkci Gal3p u *S. cerevisiae* (Meyer et al., 1991).

Represor genů *GAL*, Gal80p, se v nepřítomnosti galaktózy váže na hlavní aktivátor genů *GAL*, Gal4p, a tvoří s ním komplex inhibující transkripci (Apostu a Mackey, 2012). Interakce aktivovaného Gal3p s Gal80p vede k uvolnění represe aktivátoru Gal4p a následné aktivaci transkripce efektorových genů *GAL*. Výsledkem této kaskády je aktivace exprese genů galaktózového metabolismu a následná přeměna galaktózy na metabolit, který může být začleněn do glykolytické dráhy (shrnutí v Johnston et al., 1987). Při plné aktivaci dosahuje

hladina efektorových enzymů Leloiroy dráhy (*GAL1*, *GAL7* a *GAL10*) přibližně 5% celkového obsahu proteinů v buňce (Bhat et al., 2008). Přítomnost glukózy působí naopak represi regulačního obvodu *GAL* prostřednictvím aktivace glukózového represoru Mig1p. Tento protein se v přítomnosti glukózy přesouvá do buněčného jádra a vazbou do regulačních oblastí *GAL1* a *GAL4* reprimuje transkripci efektorových genů *GAL* (Nehlin et al., 1991).



Obr. 3. Schéma regulační kaskády genů *GAL*; převzato a upraveno z Nehlin et al., 1991

### 3.3 Základní stavy systému *GAL* a jeho regulátory

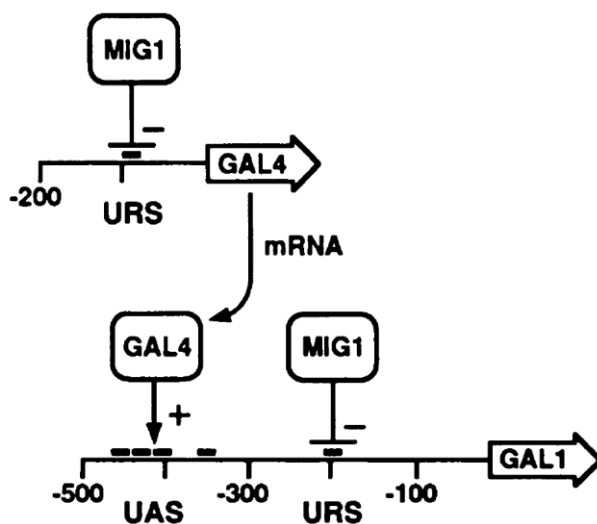
Efektorový systém *GAL* u *S. cerevisiae* se může nacházet ve třech základních regulovaných stavech. Jsou jimi:

- (i) **Represe:** přítomnost glukózy, která je preferenčním zdrojem uhlíku.
- (ii) **Preindukce:** přítomnost nefermentovatelného<sup>5</sup> zdroje uhlíku (např. glycerol nebo rafinóza).
- (iii) **Aktivace (indukce):** přítomnost galaktózy, nebo galaktózy a nefermentovatelného zdroje uhlíku.

<sup>5</sup> Rozumí se zdroj uhlíku, který není kvasinka *S. cerevisiae* schopna metabolizovat glykolytickou dráhou na etanol.

### 3.3.1 Represe

Přítomnost glukózy navozuje u kvasinky *S. cerevisiae* stav, za kterého je efektorový systém *GAL* inaktivován. Bazální hladina exprese efektorových genů *GAL*<sup>6</sup> je zanedbatelná, avšak hladina exprese regulačních genů se pohybuje okolo 10 - 20 %, pro *GAL80*, respektive 30 - 50 %, pro *GAL4*, vůči hladině exprese v médiu obsahujícím pouze galaktózu. V přítomnosti glukózy je represe zajištěna produktem genu *MIG1*. Mig1p může být fosforylován protein kinázou Snf1p, tehdy dochází k jeho transportu z buněčného jádra do cytoplazmy (DeVit et al., 1997; Treitel et al., 1998). V přítomnosti glukózy je Mig1p defosforylován a lokalizován v buněčném jádře, kde působí coby obecný glukózový represor určitých skupin genů (*GAL*, *SUC*, *MAL*). Váže se do promotorových oblastí těchto genů a vyvazuje obecný korepresorový komplex Ssn6p – Tup1p. Komplex Ssn6 – Tup1 zajišťuje represi genů v odpovědi na přítomnost glukózy, poškození DNA, kyslíkový stres, či jiné signály (DeVit et al., 1997; Tzamarias a Struhl, 1995; Keleher et al., 1992). Mig1p reprimuje transkripci genů *GAL* (i) nepřímo - represí transkripce aktivátoru *GAL4* vazbou specifické sekvence regulační oblasti *GAL4* (**U**pstream **R**epression **S**equences of *GAL* - **URS**<sub>G</sub>); (ii) přímo - vazbou URS<sub>G</sub> v regulační oblasti *GAL1* (Obr. 5.).



Obr. 5. Represe zprostředkovaná Mig1p; převzato z Nehlin et al. 1991

<sup>6</sup> s výjimkou *GAL5*

### 3.3.2 Preindukce

Není-li v okolí buňky dostupná ani glukóza, ani galaktóza, musí být přítomen mechanismus zajišťující represi efektorových genů *GAL* na glukóze nezávislým způsobem. V této situaci je represe zajištěna pouze produktem genu *GAL80* (Hopper a Rowe, 1978; Bajawa et al., 1988). Gal80p obsahuje vazebná místa pro proteiny Gal4p i Gal3p a je cílen k transportu do jádra (Pilauri et al., 2005), kde váže transkripční aktivátor Gal4p. Gal80p svojí vazbou na Gal4p maskuje jeho C-terminální aktivační doménu a brání tak aktivaci transkripce genů aktivovaných Gal4p (Apostu a Mackey, 2012; shrnuto v Johnston et al., 1984). Gal80p tvoří s vysokou afinitou homodimer, který obdobně váže dimer Gal4p přítomný na  $UAS_G$ . Tímto dochází k účinné stabilizaci komplexu DNA (Gal4p)<sub>2</sub> (Gal80p)<sub>2</sub> (Melcher a Xu, 2001). V přítomnosti nefermentovatelného zdroje uhlíku, který nepodléhá preferenční katabolické dráze kvasinky *S. cerevisiae*, nedochází k aktivaci efektorových genů *GAL*. Regulační geny (*GAL80*, *GAL3*, *GAL4*) vykazují bazální hladinu exprese, čímž je zajištěna indukovatelnost celého systému v případné přítomnosti galaktózy (Apostu a Mackey, 2012; shrnuto v Lohr et al., 1995). Taktéž exprese *MEL1*, kódující sekretovanou  $\alpha$ -galaktozidázu, vykazuje relativně vysokou bazální hladinu exprese. Hladina exprese genu *GAL4* je za stavu preindukce nejvyšší, množství Gal4p tehdy dosahuje zhruba dvojnásobku množství v přítomnosti galaktózy. Za stavu preindukce je celý efektorový systém *GAL* schopen velmi rychlé indukce trvající řádové minuty, což vyplývá z přítomnosti aktivátoru Gal4p na  $UAS_G$ . Tento mechanismus se nejspíše vyvinul za účelem rychlé aktivace efektorových genů *GAL*, v případě, že se galaktóza stane jedním z hlavních zdrojů uhlíku v okolním prostředí (shrnutu v Lohr et al., 1995).

### 3.3.3 Aktivace (indukce)

Hlavními regulačními elementy genů *GAL* jsou aktivační sekvence genů *GAL* (**U**pstream **A**ctivation **S**equences of **G**AL genes) - dále  $UAS_G$ . Tyto specifické úseky DNA představují vazebná místa pro Gal4p.  $UAS_G$  se vyskytují v různém počtu v regulačních oblastech efektorových i regulačních genů *GAL*; bývají lokalizované 100 až 385 párů bazí upstream od místa iniciace transkripce. Tyto elementy mají délku představující 17bp a konsensus sekvenci 5'CGGAGGAC T/A CTGCTCCG 3' (Guarente et al., 1982; shrnuto v Lohr et al., 1995).

Při vazbě Gal4p na  $UAS_G$  se uplatňuje tzv. kooperativní efekt, což znamená, že afinita Gal4p k  $UAS_G$  se zvyšuje v blízké přítomnosti dalších  $UAS_G$  s již navázaným Gal4p (Ginger a Ptashne,



1988). Tímto je zajištěna vyšší hladina exprese genů *GAL*, které ve svých regulačních oblastech obsahují větší počet  $UAS_G$ . V regulační oblasti genů *GAL1* a *GAL10* se vyskytují čtyři  $UAS_G$ , zatímco v případě genů *GAL2* a *GAL7* se zde nachází pouze dvě  $UAS_G$ . Regulační geny *GAL80* a *GAL3* mají ve svých regulačních elementech pouze jedno vazebné místo pro Gal4p (Bram et al., 1986; shrnuto v Lohr et al., 1995). Gen *GAL4* však ve svých regulačních sekvencích neobsahuje žádná  $UAS_G$ , což znamená, že jeho exprese není regulována mechanismem typickým pro ostatní geny *GAL* (shrnutí v Lohr et al., 1995). Hladina regulačních genů *GAL3* a *GAL80* dosahuje za stavu plné indukce tři až pětinašobně zvýšené hladiny, respektive pěti až desetinašobně zvýšené exprese vůči neindukčním podmínkám (Bajwa et al., 1988; Shimada a Fukasawa, 1985).

Monomer Gal4p je tvořen 881 aminokyselinami, z nichž posledních 113 aminokyselin na jeho C-konci představuje aktivační doménu (Laughon a Gesteland, 1984; Ma a Ptashne, 1987) schopnou interakce s transkripčními faktory, zejména s TATA vazebným proteinem (TATA binding protein - TBP) (Melcher a Johnston, 1995). Prvních 100 aminokyselin na N-terminálním konci proteinu *GAL4* tvoří specifickou DNA vazebnou doménu s motivy zinkového prstu. Tato DNA vazebná doména obsahuje  $Zn^{2+}$  ionty koordinované šesti cysteinovými zbytky a je schopna vázat triplet CGG na koncích  $UAS_G$  (Carey et al., 1989; shrnuto v Lohr et al., 1995). Samotný Gal4p se v buňce vyskytuje jen ve velmi malých koncentracích představujících zhruba 0,1 kopii Gal4p na buňku (Laughon a Gesteland, 1982).

### 3.3.4 Modely molekulárních mechanismů aktivace transkripce genů *GAL*

Přesný molekulární mechanismus přenosu signálu o přítomnosti galaktózy v buňce, vedoucí k aktivaci transkripce genů *GAL*, není dosud zcela objasněn. V průběhu minulých dvou desetiletí vzniklo několik modelů aktivace regulačního obvodu *GAL* (shrnutí v Sellick a Reece, 2005).

První představou o přenosu signálu v regulačním obvodu *GAL* byl takzvaný *nedisociační* model, který předpokládá, že k aktivaci transkripce genů *GAL* dochází prostřednictvím tripartitního komplexu Gal4p-Gal80p-Gal3p (Obr. 4. A). Základem tohoto modelu byla studie Platta a Reece, kteří s využitím metody nativní elektroforézy, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), prokázali *in vitro* vazbu proteinů Gal4p-Gal80p-Gal3p (Platt a Reece, 1998).

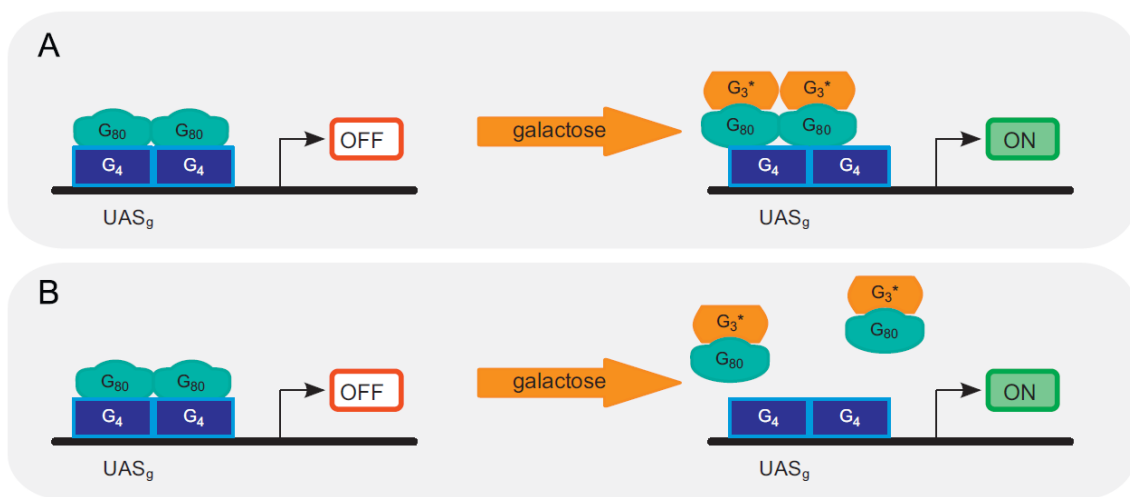
Platnosti *nedisociačního* modelu nasvědčuje i pozorování, že aktivátor Gal4p purifikovaný z buněk *S. cerevisiae* rostoucích jak v přítomnosti galaktózy, tak v její nepřítomnosti, se v obou případech nachází v komplexu s Gal80p (Parthun a Jaehning, 1992). Výsledky studie využívající metody FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) poukazují na skutečnost, že k disociaci Gal80p-Gal4p nedochází ani za přítomnosti galaktózy v buňkách, ani za její nepřítomnosti (Bhaumik et al., 2004). *Nedisociační* model podporují i nezávislá matematická modelování dynamiky systému GAL (Apostu a Mackey, 2012).

Protipól *nedisociačního* modelu představuje model *disociační* (Obr. 4. B). Tento model předpokládá, že k aktivaci transkripce genů GAL dochází po disociaci komplexu Gal3p-Gal80p z Gal4p. *Disociační* model podporují výsledky chromatinové imunoprecipitace, které prokázaly významné oslabení interakce mezi Gal80p a Gal4p při růstu buněk v přítomnosti galaktózy (Sil et al, 1999; Peng a Hopper, 2002).

Ve zdánlivém rozporu s *nedisociačním* modelem by mohl být Pengův a Hopperův model *jaderné deplece* předpokládající, že Gal3p představuje výhradně cytoplazmatický protein a k jeho interakci s Gal80p tedy nedochází v jádře (Peng a Hopper, 2000). V tomto modelu se galaktózou aktivovaný Gal3p váže na Gal80p a zabraňuje tak jeho transportu do jádra, tímto je narušena rovnováha mezi cytoplazmatickou a jadernou koncentrací Gal80p vedoucí k jeho transportu z jádra. Následkem deplece Gal80p v jádře dochází k aktivaci transkripce genů GAL. V souladu s touto hypotézou je skutečnost, že ukotvení rekombinantního Gal3p k cytoplazmatické membráně, s cílem zabránit jeho případnému transportu do jádra, nijak nenarušuje aktivaci genů GAL po indukci galaktózou (Peng a Hopper, 2002).

V roce 2009 Hopperova skupina získala výsledky, které prokázaly přítomnost proteinu Gal3p v cytoplazmě i v jádře, a to jak v přítomnosti galaktózy, tak i v její nepřítomnosti. Tímto došlo k definitivnímu odklonu od modelu *jaderné deplece*. Tato studie, vycházející z *in vivo* pozorování fluorescenčně značených regulačních proteinů, však nepodporuje ani platnost *nedisociačního* modelu, nýbrž mluví silně ve prospěch modelu *disociačního* (Jiang et al., 2009).

Všechny výše uvedené modely aktivace genů *GAL* mohou být do jisté míry relevantní, avšak je nutno zohlednit možná úskalí metod používaných k průkazu příslušných modelů. Skutečné procesy odehrávající se při aktivaci genů *GAL in vivo* se zdají být kombinací těchto modelů. Klíčovou událostí pro aktivaci je patrně změna konformace proteinu Gal80p, v důsledku interakce s aktivovaným Gal3p, která vede k odmaskování aktivační domény Gal4p. K disociaci komplexu Gal3p-Gal80p může a nemusí docházet, avšak Gal4p je patrně schopen aktivace i v komplexu s Gal3p-Gal80p.



Obr. 4. Schéma dvou modelů aktivace regulonu *GAL*; převzato z Apostu a Mackey, 2012

(A) *Nedisociační model*: Při indukci zprostředkované galatózou dochází k aktivaci transkripce genů *GAL* prostřednictvím tripartitního komplexu Gal4p-Gal80p-Gal3p. (B) *Disociační model*: K aktivaci transkripce genů *GAL* dochází díky fyzické interakci s Gal3p s Gal80p, která zabraňuje Gal80p ve vazbě ke Gal4p.

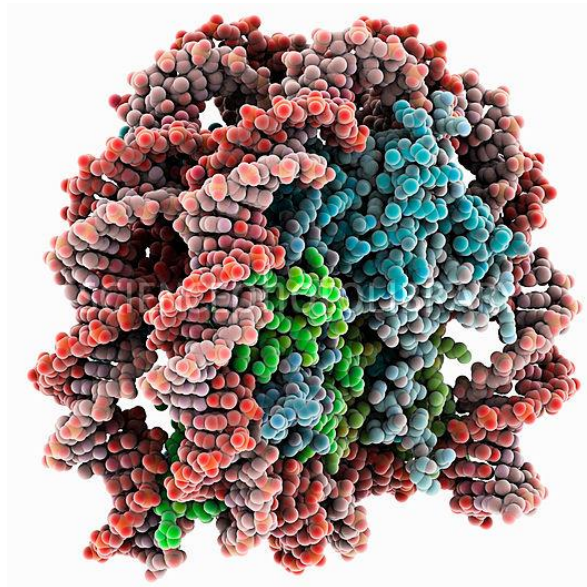
Genový systém *GAL* se díky snadné možnosti indukce, respektive represe, která závisí na přítomnosti galaktózy v médiu s výhodou využívá v genovém inženýrství a molekulárně biologickém výzkumu; například k nadprodukci požadovaných proteinů nebo ke studiu proteinových interakcí.

## 4 Chromatin a jeho role v regulaci exprese systému *GAL*

### 4.1 Struktura chromatinu

U eukaryotických organismů je jaderná DNA uspořádána pomocí histonů, což jsou bazické proteiny, které v komplexu s DNA tvoří chromatin. Základními stavebními a organizačními jednotkami chromatinu jsou nukleozomy tvořené vždy dvěma kopiemi histonů H2A, H2B, H3 a H4. Na každý oktamer histonů se váže zhruba 147 párů bazí DNA, která každý nukleozom obtáčí přibližně 1,65 krát (Obr. 6.). DNA mezi jednotlivými nukleozomy se nazývá lineková DNA, tato DNA je vázána histonem H1. Histon H1 tvoří součást vlastního jádra nukleozomu, ale má stabilizační funkci a je zodpovědný za vyšší úroveň kondenzace chromatinu. Histony představují jedny z nejkonzervovanějších proteinů mezi eukaryoty, například histon H4 hrachu (*Pisum sativum*) a skotu (*Bos taurus*) se liší pouhými dvěma aminokyselinami (převzato z Alberts a kolektiv, 2005). Struktura chromatinu je velice dynamická a neustále se mění v závislosti na fázi buněčného cyklu a vlivech prostředí, v němž se buňka nachází. Úseky chromatinu, na nichž probíhá aktivní transkripce vyznačující se rozvolněnou strukturou DNA na nukleozomu, se označují jako euchromatin. Termínem heterochromatin se pak rozumí nejkoncentrovanější oblasti chromatinu, nejčastěji v oblastech centromer a telomerických oblastí.

Na molekulární úrovni ovlivňují strukturu chromatinu kromě fyzikálních faktorů i specializované proteinové komplexy katalyzující posttranslační modifikace histonových proteinů. Posttranslační modifikace histonů hrají klíčovou roli ve zprostředkování interakce DNA s transkripčními faktory, avšak též přispívají ke změnám chromatinové struktury. Tyto modifikace se týkají především N-koncových zbytků histonových proteinů, jsou dynamické a zvrátané. Mezi nejběžnější histonové modifikace patří acetylace, fosforylace, methylace a ubiquitinylace. Hlavním účelem těchto modifikací je, kromě změny struktury chromatinu, segregace chromozomů, replikace DNA či rekombinace, i regulace genové exprese (shrnutí v Jansen a Versteppen, 2011). Modifikace histonů mohou přispívat k regulaci transkripce (i) přímo - změnami interakce DNA s histony nebo (ii) nepřímo - vyvazováním transkripčních faktorů, které následně ovlivňují transkripci (shrnutí v Kouzarides et al., 2007).



Obr. 6. Model komplexu nukleozomu a DNA; převzato ze Science Photo Library ([www.sciencephoto.com/media/152910/view](http://www.sciencephoto.com/media/152910/view))

Po obvodu je červeně naznačena molekula DNA, modře a zeleně nukleozomové jádro tvořené histony.

#### 4.2 Chromatinové remodelační a histonové modifikační komplexy

Nukleozomy samy o sobě představují bariéru zabraňující transkripčnímu aparátu v interakci s DNA, změna uspořádání nukleozomů je tudíž nezbytná pro průběh transkripce. Inicie transkripce tedy vyžaduje uvolnění nukleozomové bariéry na promotorech prostřednictvím funkčně specifických enzymů. Na změnách struktury chromatinu se podílí chromatinové remodelační komplexy, což jsou proteinové komplexy využívající energie ve formě ATP ke změnám histonového složení a mobility nukleozomů. U kvasinky *S. cerevisiae* existují různé skupiny chromatinových remodelačních komplexů, jsou jimi: SWI/SNF (switch/sucrose-nonfermentable), ISWI (imitation switch), INO80 (inositol-requiring) a CHD (chromo-helicase/ATPase –DNA-binding) (shrnutí v Clapier a Cairns, 2009).

Histonové modifikační komplexy napomáhají ke změně vlastností chromatinu katalýzou posttranslačních modifikací histonů. Do skupiny chromatinových modifikačních komplexů kvasinky *S. cerevisiae* se řadí například deacetylázy histonů (HDAC), acetyltransferázy histonů (HAT), nebo methyltransferázy a mnohé další komplexy. Chromatinové modifikace vzniklé

působením těchto modifikačních enzymů představují pomyslný „histonový kód“, který může být rozpoznáván dalšími komponenty buněčného aparátu (shrnutí v Cosgrove et al., 2004).

#### 4.2.1 Komplex Swi/Snf a komplex RSC

Komplex Swi/Snf kvasinky *S. cerevisiae*<sup>7</sup> byl vůbec prvním objeveným chromatinovým remodelačním komplexem. Záhy byla mnoha studiemi prokázána jeho konzervovanost napříč ostatními eukaryoty. Jedná se o proteinový komplex s ATPázovou aktivitou, který je schopen měnit pozici nukleozomů na DNA. Bylo zjištěno, že Swi/Snf se váže přímo na nukleozomové jádro a přispívá k rozvolnění komplexu tvořeného DNA a histony, při této interakci však nedochází k disociaci DNA z jádra nukleozomu. Komplex Swi/Snf bývá spojován především s aktivací transkripce, jelikož napomáhá k vazbě transkripčních aktivátorů na DNA a tedy nepřímo k odstranění nukleozomů z promotorových oblastí genů (Côté et al., 1994; Côté et al., 1998).

Chromatinový remodelační komplex RSC vykazuje podobnost s komplexem Swi/Snf<sup>8</sup>. Oba komplexy využívají energie ve formě ATP ke změně struktury nukleozomů. Komplex RSC patří mezi nejhojněji zastoupené remodelátory chromatinu kvasinky *S. cerevisiae*, u níž se vyskytuje v přibližně desetkrát větším množství než komplex Swi/Snf. Aktivita komplexu RSC je nezbytná pro mitotický růst a správný průběh buněčného cyklu (Cairns et al., 1996; Cao et al., 1997, shrnutí v Rando et al., 2012). Mezi funkce tohoto remodelačního komplexu patří rovněž odstraňování nukleozomů z promotorových oblastí transkribovaných genů (Badis et al., 2008).

#### 4.2.2 Komplex SAGA

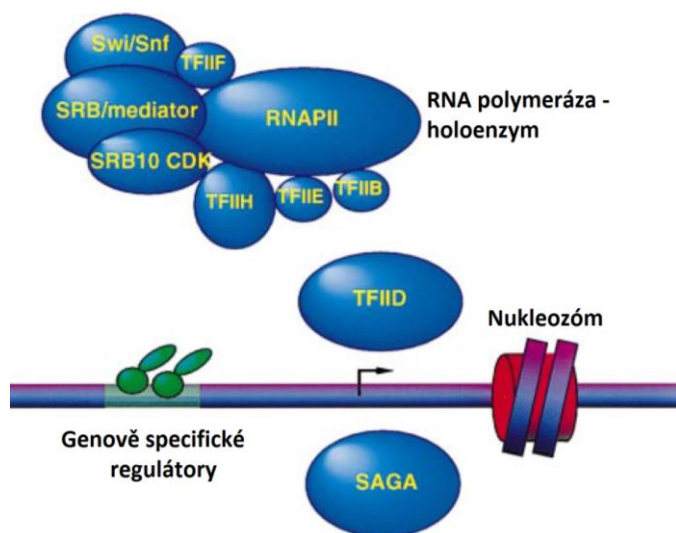
SAGA, neboli **S**pt-**A**da-**G**cn5 acetyltransferázový komplex, je multipodjednotkový histon-acetyltransferázový komplex acetylující lyziny a argininy histonů, které tvoří jádro nukleozomu (Bradbury et al., 1992). Acetylace histonů představuje zeslabení elektrostatické interakce záporně nabitých molekul DNA a kladně nabitých aminokyselin histonových proteinů. Komplex SAGA proto způsobuje rozvolnění komplexu DNA s jádrem nukleozomu.

---

<sup>7</sup>Swi/Snf byl objeven na mutantech *S. cerevisiae* neschopných přepínání (**Switch**) párovacích typů, resp. neschopných fermentace sacharózy (**S**ucose **n**on-**f**ermentable)

<sup>8</sup> Tři z patnácti podjednotek komplexu RSC vykazují homologii s remodelačním komplexem Swi/Snf (Cairns et al., 1996)

Vlastní katalytická podjednotka acetyltransferázového komplexu SAGA se nazývá Gcn5, tato podjednotka zajišťuje přenos acetylového zbytku na histony H2B a H3 (Grant et al., 1997). Další podjednotky komplexu SAGA, Spt8 a Spt3, interagují s proteinem vážící TATA box (**T**ATA **b**inding **p**rotein - TBP), což je obecný transkripční faktor. Acetyltransferázový komplex SAGA představuje multifunkční koaktivátor účastnící se transkripce RNA polymerázou II (Obr. 7.) (Wu et al., 2004).



Obr. 7. Model transkripčního aparátu, převzato a upraveno z Holstege et al., 1998

#### 4.2.3 Rpd3p

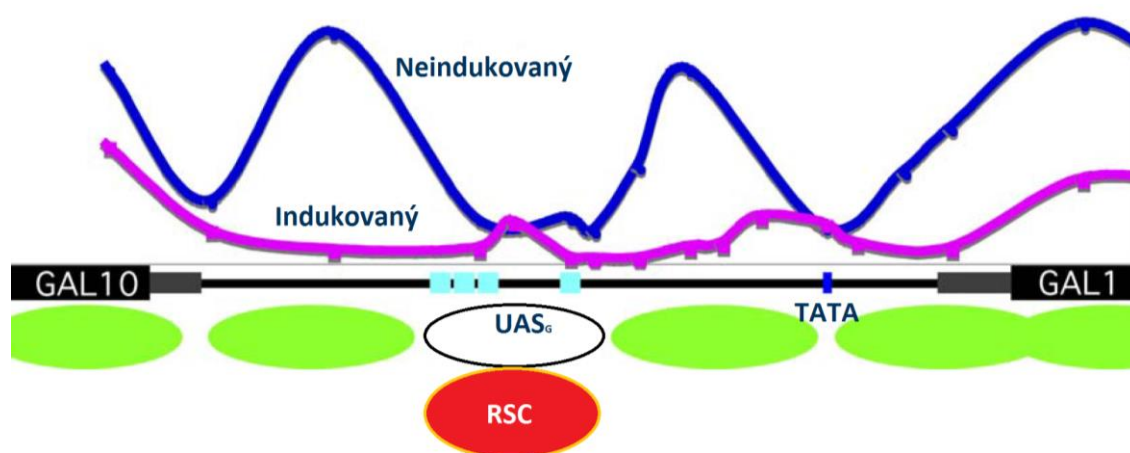
Rpd3p patří do skupiny histon deacetyláz (HDAC), které katalyzují odstranění acetylové skupiny z aminokyselinových zbytků histonových proteinů. Na rozdíl od histon acetyltransferáz (HAT) tedy působí zesílení elektrostatické interakce mezi DNA a histony, čímž navozuje ustavení represivního uspořádání chromatinu. Histon deacetyláza Rpd3p se vyskytuje ve dvou komplexech, větším Rpd3L (**L**arge) a menším Rpd3S (**S**mall). Bylo prokázáno, že Rpd3p je často vyvazována represory transkripce. Přítomnost Rpd3p na promotorech genů snižuje výskyt pozitivních regulátorů transkripce, komplexu Swi/Snf a SAGA (Deckert a Struhl., 2002; Hassan et al., 2001). Ačkoli jsou histon deacetylázy spojovány především s represí transkripce, je známa i jejich role v aktivaci transkripce (Sharma et al., 2007, Carozza et al., 2005). Komplex Rpd3L bývá vyvazován sekvenčně specifickými vazebnými proteiny na promotorech genů a přispívá k deacetylaci zejména v oblastech blízkých promotorům (Kadosh a Struhl, 1998 a, b). Komplex Rpd3S se naléz

zpravidla na kódujících obastech aktivně transkribovaných genů, zde působí deacetylaci po průchodu transkripčního aparátu daným úsekem genu. Tímto mechanismem zabraňuje Rpd3S náhodné iniciaci transkripce z intragenových oblastí (Carozza et al., 2005; Joshi a Struhl et al., 2005).

#### **4.3 Změna struktury nukleozomů v oblasti genů *GAL1,-10* po indukci galaktózou**

Nezávislé studie došly k závěru, že při represi genů *GAL1* a *GAL10* se v promotorové oblasti vyskytují dva jasně lokalizované nukleozomy zabraňující iniciaci transkripce. Tyto nukleozomy musí být před iniciací odstraněny, aby mohlo dojít k vazbě transkripčního aparátu na DNA (Bryant et al., 2008; Cavalli and Thoma, 1993; shrnuto v Lohr et al., 1997). Dříve se předpokládalo, že v oblasti  $UAS_G$  genů *GAL1* a *GAL10* se nenacházejí žádné nukleozomy, které by zabraňovaly vazbě transkripčního aktivátoru Gal4p (Cavalli and Thoma, 1993; Fedor et al., 1988). Výsledky zkoumání Bryanta a kolektivu však prokázaly, že domnělé místo neobsahující nukleozomy (NFR - **N**ucleosome**F**ree **R**egion) v oblasti  $UAS_G$  *GAL1,-10* je konstitutivně obsazeno neznámou strukturou. Tato struktura nevykazovala vlastnosti běžného nukleozomu, avšak v době objevu této struktury se ji nepodařilo identifikovat (Bryant et al., 2008). Toto dilema pomohla objasnit až novější studie Floerové, která prokázala, že na  $UAS$  genů *GAL1,-10* je přítomen abnormální nukleozom. Tento nukleozom obsazoval o cca 30 bp kratší úsek DNA než ostatní nukleozomy lokusu *GAL1,-10* a byl asociován s remodelačním komplexem RSC (Obr. 8.). Komplex RSC s nukleozomem váže DNA tak, že *de facto* napomáhá vazbě Gal4p na  $UAS_G$  (Floer et al., 2010).





Obr. 8. Pozice nukleozomů v oblasti promotoru *GAL1* a *GAL10*; převzato a upraveno z Bryant et al., 2008

Zeleně jsou označeny nukleozomy obsazující regulační oblasti a oblasti ORF genů *GAL1* a *GAL10*. Černé obdélníky představují ORF *GAL1* a *GAL10* a šedé obdélníky oblasti mezi počátkem transkripce a počátkem translace. Modrá a fialová křivka zobrazují detekovanou přítomnost nukleozomů pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP) v uvedených stavech.

Protein Gal4p je ve svém aktivním stavu schopen postupně vyvazovat různé transkripční faktory. Na tuto skutečnost poukázali Bryant a Ptashne, kteří ve své studii nepřímo prokázali, že při aktivaci genů *GAL* vyvazuje Gal4p nejprve komplex SAGA, posléze mediátorový komplex a nakonec RNA polymerázu II s obecnými transkripčními faktory (Bryant a Ptashne, 2003). Ještě předtím však Gal4p přitahuje do oblasti  $UAS_G$  remodelátory chromatinu Swi/Snf, které přispívají k odstranění nukleozomů z promotorové oblasti efektorových genů *GAL* (Bryant et al., 2008). K indukci transkripce genů *GAL10* a *GAL1* může docházet i bez přítomnosti remodelátorů chromatinu Swi/Snf, pouze za pomoci Gal4p, tehdy však dochází k podstatnému zpoždění indukce exprese těchto genů (Bryant et al., 2008).

Současné studie poskytují určitou představu o změně struktury nukleozomů v oblasti genů *GAL1* a *GAL10* za podmínek galaktózou zprostředkované aktivace. V represivních podmínkách zůstávají nukleozomy v oblasti otevřeného čtecího rámce (**open reading frame - ORF**) i promotoru stabilně lokalizovány, zatímco za stavu aktivní transkripce dochází v promotorové oblasti genů *GAL1* a *GAL10* k delokalizaci a zvýšenému rozvolnění komplexu nukleozomů a DNA. Po přenesení buněk z čistě galaktózového média do čistě

glukózového média dochází k represi exprese genů *GAL* a poměrně rychlému nastolení represivní formace nukleozomů. Jsou-li však buňky přeneseny z čistě galaktózového média do média obsahujícího glukózu v kombinaci s galaktózou, dochází u nich k represi transkripce genů *GAL1* a *GAL10*, která však není doprovázena ustavením stabilně lokalizovaných nukleozomů v oblasti  $UAS_G$ . Gal4p je v těchto podmínkách stále navázán na  $UAS_G$  společně s komplexy Swi/Snf a zabezpečuje tak odstanění promotorových nukleozomů, stejně jako za stavu aktivace. Z Bryantova pozorování vyplývá, že odstranění nukleozomů z oblasti promotoru a ORF genů *GAL1*, *GAL10* je nutné k aktivaci transkripce, avšak přítomnost nukleozomů sama o sobě není nutná k represi těchto genů (Bryant et al., 2008).

#### 4.4 Role nekódující RNA v regulaci transkripce genů *GAL*

Nekódující RNA (ncRNA) plní v eukaryotických buňkách rozsáhlé množství funkcí; kromě obecně známých procesů, jako jsou translace či sestřih, se také významně podílí na regulaci genové exprese (shrnuto v Mattick a Makunin, 2006). Přestože se dnes již ví o početném zastoupení nekódujících transkriptů kvasinky *S. cerevisiae*, není zcela jednoduché objasnit jejich funkci, či tyto transkripty vůbec identifikovat. Nekódující RNA jsou často velmi těžko detekovatelné díky své nestabilitě, nízké hladině exprese či expresi pouze za specifických podmínek (Samanta et al., 2006; Kavanaugh a Dietrich, 2009).

Jednou z relativně nedávno objevených ncRNA u *S. cerevisiae* je přibližně 4 kilobáze dlouhá nekódující RNA vyskytující se v oblastech genů *GAL1* a *GAL10* (dále *GAL10*-ncRNA). Tato nekódující RNA představuje antisense RNA genu *GAL10*, jejíž počátek transkripce se nachází v 3'oblasti genu *GAL10* (Steinmetz et al., 2006; Houseley et al., 2008). V buňkách se vyskytuje pouze cca v jedné kopii na 14 buněk. Produkce *GAL10*-ncRNA se odehrává pouze za podmínek represe genů *GAL* nebo v neindukčních podmínkách (rafinóza). Ve 3'oblasti genu *GAL10* byla nalezena vazebná místa pro protein Reb1p a následně bylo zjištěno, že přítomnost tohoto proteinu je nutná k transkripci *GAL10*-ncRNA (Houseley et al., 2008).

Reb1p (**R**ibozomal **e**nhaner **b**inding) představuje pro *S. cerevisiae* esenciální DNA vazebný protein podílející se na regulaci transkripce RNA polymerázou I a RNA polymerázou II (Graham a Chambers et al., 1994; Packham et al., 1996; Morrow et al., 1990). Je tvořen 810

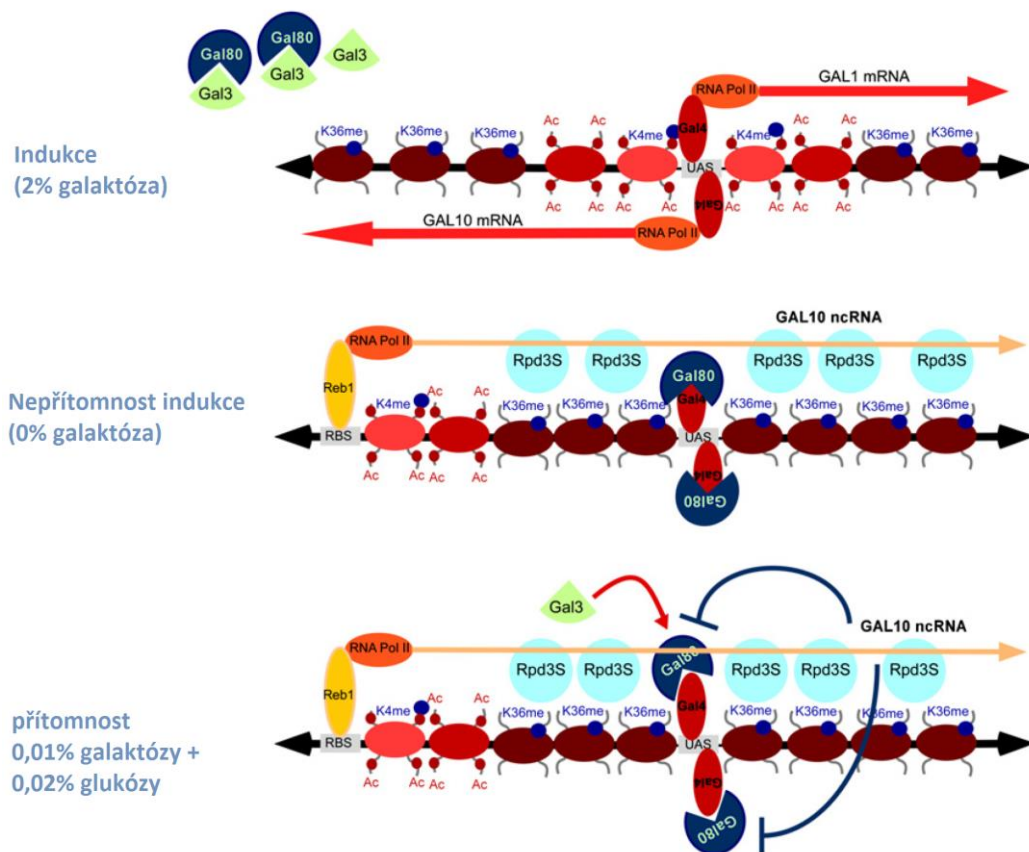
aminokyselinami a váže se na konsensus sekvence CCGGGTAA vyskytující se především v enhancerových a promotorových oblastech obsahujících geny pro ribozomální RNA (Ju et al., 1990; Morrow et al., 1990). Právě proto byly proteinu Reb1p dříve připisovány funkce související především s organizací jádérka a terminací RNA polymerázy I transkribující ribozomální RNA. Morrow a kolektiv prokázali, že tento protein je také zodpovědný za změnu struktury nukleozomů v oblasti genů *GAL1* a *GAL10* (Morrow et al., 1989; Morrow et al., 1990).

#### **4.4.1 Souvislost methylace histonů v oblasti genů *GAL1*, *GAL10* a přítomnosti ncRNA**

Methylace histonů patří mezi posttranslační modifikace, které mohou přispívat jak k aktivaci transkripce, tak k represivnímu uspořádání chromatinu zabraňujícímu iniciaci transkripce. V případě histonů dochází k methylaci pouze na lyzinových a argininových zbytcích (shrnuto v Zhang a Reinberg, 2001). Methylaci histonů katalyzují specifické methyltransferázy nebo methyltransferázové komplexy; jedním z takovýchto komplexů je COMPASS (**COM**plex of **P**roteins **AS**sociated with **Set**1) s vlastní katalytickou podjednotkou Set1, katalyzující methylaci histonu H3 na lyzinu K4 (H3K4me) (Briggs et al., 2001). Trimethylace histonu H3 na lyzinu 4 (H3K4me3) v kódujících oblastech byla dříve spojována především s aktivně transkribovanými geny a euchromatinem (Santos-Rosa et al., 2002). Carvin a Kladde v roce 2004 prokázali, že ztráta H3K4me3 vede k derepresi transkripce genů *PHO5*, *PHO84* i *GAL1* (Carvin a Kladde, 2004).

Další methylace vyskytující se v oblasti genů *GAL1*, *GAL10* je methylace histonu H3 na lyzinu 36 (H3K36me). Tato methylace, katalyzovaná methyltransferázou Set2, se vyskytuje především v promotorových a kódujících oblastech genů (Xiao et al., 2003). K methylaci H3K36 dochází během elongační fáze transkripce a je dávana do souvislosti s transkripční represí (Strahl et al., 2002). Mechanismus tohoto jevu je následující: methyltransferáza Set2 interaguje s C-terminální doménou RNA polymerázy II a katalyzuje H3K36me při průchodu RNA polymerázy II transkribovanou oblastí (Schaft et al., 2003). Methylační značka H3K36 je následně rozeznávána histon deacetylázovým komplexem Rpd3S, který ustavuje represivní uspořádání chromatinu v transkribovaných oblastech (Keogh et al., 2005; Carrozza et al., 2005).

Oblast genů *GAL1* a *GAL10* je charakteristická rozložením methylace histonů H3, které se mění v závislosti na aktivitě či represi transkripce těchto genů (Houseley et al., 2008; Pinskaya et al., 2009). V přítomnosti galaktózy se v 5' oblastech genů *GAL1* i *GAL10* vyskytuje di- a trimethylace histonu H3 na lyzinu 4 (H3K4me2,3). Přítomnost methylace v oblasti lokusu *GAL1,-10* se zcela mění při represi exprese těchto genů, kdy se H3K4me3 vyskytuje zejména ve 3' oblasti genu *GAL10*. Tento neobvyklý výskyt H3K4me3 byl dáván do souvislosti s aktivací transkripce *GAL10*-ncRNA. Houseley dále prokázal, že tato methylace je podmíněna vazbou Reb1p do oblasti genu *GAL10*. V průběhu transkripce *GAL10*-ncRNA dochází v oblasti genů *GAL1,-10* k methylaci histonu H3 na lyzinu 36. H3K36me v této oblasti následně vede k vyvazování komplexu histon deacetylázy Rpd3S, která ustavením represivní struktury chromatinu zabraňuje transkripci genů *GAL1,-10*. K transkripci *GAL10*-ncRNA může docházet i v přítomnosti směsi galaktózy s glukózou, čímž dochází k zesílení represe sense transkripce genů *GAL1* a *GAL10*. Tento pozoruhodný regulační mechanismus pravděpodobně kvasince *S. cerevisiae* napomáhá k efektivnějšímu využívání živin z okolí, má-li k dispozici směs různých cukrů (Obr. 9.) (Houseley et al, 2008).



Obr. 9. Model regulace exprese genů *GAL* prostřednictvím *GAL10*-ncRNA; převzato a upraveno z Houseley et al., 2008

**Indukce:** Geny *GAL1*, -10 jsou transkribovány, ve 3'oblastech *GAL1*, -10 se vyskytuje H3K36me zabraňující proteinu Reb1p ve vazbě 3'oblasti *GAL10* a tudíž nedochází k transkripci *GAL10*-ncRNA.

**Nepřítomnost indukce:** Transkripce *GAL1*, -10 neprobíhá, Reb1p se váže na kódující oblast *GAL10* a umožňuje H3K4me, která pozitivně ovlivňuje transkripci *GAL10*-ncRNA. Transkripce *GAL10*-ncRNA vede k H3K36me napříč kódující oblastí *GAL1*, -10. H3K36me vyvazuje deacetylázy histonů Rpd3S ustavující represivní strukturu chromatinu v místech iniciace transkripce *GAL1*, -10.

**Přítomnost 0,01% galaktózy a 0,02% glukózy:** Reb1p se váže do 3'oblasti *GAL10* a může tak docházet k transkripci *GAL10*-ncRNA. Proces transkripce *GAL10*-ncRNA indukuje represivní uspořádání chromatinu napříč oblastí genů *GAL1*, -10; to vede k zesílení represe transkripce genů *GAL1*, -10 (modré šipky) v nízkých koncentracích galaktózy, kdy zároveň dochází k aktivaci transkripce *GAL1*, -10 prostřednictvím Gal3p (červená šipka).

#### 4.5 Role jaderné lokalizace v regulaci genové exprese

Jedním z dosud nejméně prozkoumaných mechanismů regulace genové exprese je úloha jaderné lokalizace genů. Rozmístění genů v jádře není zcela náhodné, ovšem skutečný význam jaderné lokalizace uvnitř jádra není dosud spolehlivě objasněn. Stále se objevují nové studie kladoucí si za cíl odhalit funkci pozice genů uvnitř jádra, která se zdá být jedním z nezanedbatelných faktorů regulace genové exprese (shrnutí ve Fraser a Bickmore, 2007). Centrální oblast jádra je obecně spojována s přítomností euchromatinu a chromozomů s vysokou hustotou genů, zatímco poblíž jaderné periferie bývají lokalizovány zpravidla transkripčně neaktivní a heterochromatin obsahující oblasti (Gilbert et al., 2005, Croft et al., 1999). Ačkoliv mnohé experimentální důkazy svědčí o represivním vlivu jaderné periferie na transkripci genů, není toto tvrzení jednoznačné. Nedávné studie došly k závěru, že okolí jaderného póru, či přímo jeho komponenty, přispívají k aktivitě transkripce, jelikož některé aktivně transkribované geny se nachází v okolí jaderného póru (NPC – nuclear pore complex) (Mendjanet al., 2006; Vaquerizas et al., 2010). Navíc byla prokázána přímá fyzická interakce mezi jaderným proteinem Sus1p a histon acetylázovým komplexem SAGA, který patří mezi kofaktory transkripčního aparátu. Protein Sus1p představuje podjednotku komplexu SAGA a zároveň jaderného exportního systému TREX-2, proto se podílí na jaderném exportu a zároveň na regulaci transkripce (Rodríguez- Navarro et al., 2004).

Asociace aktivně transkribovaných genů s proteiny jaderného póru a jaderným exportním systémem byla v některých případech vysvětlována pomocí hypotézy „genového průchodu“ (gene-gating hypothesis; Blobel, 1985). Tato hypotéza předpokládá, že lokalizace aktivně transkribovaných genů v těsné blízkosti jaderného póru usnadňuje export mRNA z jádra, respektive zajišťuje rychlejší translaci genového produktu (Blobel, 1985). Tímto způsobem byla zároveň vysvětlována lokalizace genů *GAL1*, *GAL7* a *GAL10*, tvořících klastr na chromozomu II, které se v aktivním stavu vyskytují u jaderné periferie (Cabal et al., 2006).

Skupina Greena zmapovala s využitím fluorescenčních technik jadernou lokalizaci genů *GAL1*, *-7*, *-10* za podmínek aktivace, preindukce i represe. Z výsledků jejich pozorování plyne, že se klastr *GAL1*, *-7*, *-10* posouvá do těsné blízkosti jaderné periferie v podmínkách aktivace a preindukce s vyšší frekvencí než v represivních podmínkách. Tento genový klastr interaguje s proteiny jaderného póru prostřednictvím komplexu SAGA. Bodová mutace v podjednotce

komplexu SAGA, Ada2p, vede k přerušení interakce genového klastru *GAL1,-7,-10* s jadernou periferií. Není-li klastr *GAL1,-7,-10* lokalizován na jaderné periférii, dochází za podmínek aktivace transkripce až k čtyřnásobnému zvýšení hladiny exprese genu *GAL1*. Zároveň bylo pozorováno, že přerušením interakce genů *GAL1,-7,-10* s jadernou periferií dochází k výraznému zpoždění represe těchto genů. Tyto výsledky tedy přímo rozporují dřívější hypotézu „genového průchodu“, podle které souvisela lokalizace genového klastru *GAL1,-7,-10* na jaderné periférii s efektivnějším exportem mRNA (Green et al., 2012).

Ze závěru této studie vyplývá, že jaderná periferie má prokazatelně negativní vliv na transkripci genů *GAL*. Důvod lokalizace genů *GAL* k jaderné periférii při aktivaci by mohl být následující: Kvasinka *S. cerevisiae* potřebuje z energetických důvodů rychle reprimovat expresi genů *GAL*, pakliže se v okolí vyskytne preferenční zdroj uhlík - glukóza. Lokalizace genů *GAL* na jaderné periférii by proto mohla hrát důležitou roli při přepnutí metabolismu galaktózy na preferenční metabolismus glukózy. Autoři si tyto výsledky vysvětlují jako jednu z dalších metabolických adaptací kvasinky *S. cerevisiae* (Green et al., 2012).

## 5 Závěr

Existuje mnoho mechanismů regulace genové exprese, které buňkám umožňují efektivní a rychlé přizpůsobení okolním podmínkám. Genový systém *GAL* kvasinky *S. cerevisiae* představuje komplexní a evolučně silně konzervovaný regulační obvod, na kterém lze pozorovat různorodé adaptace k co nejefektivnějšímu využívání zdrojů uhlíku. Studium genového systému *GAL* nám umožňuje porozumět a uchopit některé aspekty transkripční regulace u eukaryot. I když dnes máme poměrně široké znalosti o obecných principech regulace genového systému *GAL*, zůstává stále ještě mnoho nezodpovězených otázek na detailní mechanismy. Regulace genů *GAL* zůstává i nadále předmětem mnoha současných studií.

Ve své práci jsem se snažila o ucelený popis základních principů regulace genů galaktózového metabolismu u kvasinky *S. cerevisiae*, stejně jako o popis hlavních aspektů regulace těchto genů za podmínek aktivace, preindukce a represe. Mou snahou bylo též poskytnout čtenáři základní informace o roli chromatinu a histonových modifikací v regulaci genového systému *GAL*. Dále jsem si kladla za cíl nastínit některé z relativně nedávno objevených mechanismů regulace genů *GAL* a demonstrovat, jak různorodých a složitých mechanismů může eukaryotická regulace nabývat. Některé další podrobnosti týkající se zejména role chromatinu v regulaci systému *GAL* nebyly, vzhledem k omezenému rozsahu mé práce, zmíněny. Tato práce by měla sloužit, jakožto podkladový materiál pro mou diplomovou práci, ve které hodlám používat genový systém *GAL* kvasinky *S. cerevisiae* pro studium transkripční regulace.



## 6 Přehled použité literatury

**Adams B.G.** 1972. Induction of Galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics of Induction and Glucose Effects. *J Bacteriol.* 111 (2):308-15.

**Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** 2005. Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky. *Espero Publishing*. 2.vydání; strana 246-256.

**Apostu R., Mackey M.C.** 2012. Mathematical model of GAL regulon dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol.* 293:219-35.

**Badis G., Chan E.T., van Bakel H., Pena-Castillo L., Tillo D., Tsui K., Carlson C.D., Gossett A.J., Hasinoff M.J., Warren C.L., Gebbia M., Talukder S., Yang A., Mnaimneh S., Terterov D., Coburn D., Li Yeo A., Yeo Z.X., Clarke N.D., Lieb J.D., Ansari A.Z., Nislow C., Hughes T.R.** 2008. A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell.* 32(6):878-87.

**Bajwa W., Torchia T.E., Hopper J.E.** 1988. Yeast Regulatory Gene GAL3: Carbon Regulation; UAS GAL Elements in Common with GAL1, GAL2, GAL7, GAL10, GAL80, and MEL1; Encoded Protein Strikingly Similar to Yeast and Escherichia coli Galactokinases. *Mol Cell Biol.* 8(8):3439-47.

**Bhat P.J., Oh D., Hopper J.E.** 1990. Analysis of the Gal3 Signal Transduction Pathway Activating Gal4 Protein-Dependent Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125(2):281-91.

**Bhaumik S.R., Raha T., Aiello D.P., Green M.R.** 2004. In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev.* 18(3):333-43.

**Blobel G.** 1985. Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(24):8527-29.

**Bradbury E.M.** 1992. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays.* 14(1):9-16.

**Bram R.J., Lue N.F., Kornberg R.D.** 1986. A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. *EMBO J.* 5(3):603-8.

**Briggs S.D., Bryk M., Strahl B.D., Cheung W.L., Davie J.K., Dent S.Y., Winston F., Allis C.D.** 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15(24):3286-95.

**Broach J. R.** 1979. Galactose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: The enzymes encoded by the GAL7, 10, 1 cluster are co-ordinately controlled and separately translated. *J Mol Biol.* 131(1):41-53.

**Bryant G.O., Prabhu V., Floer M., Wang X., Spagna D., Schreiber D., Ptashne M.** 2008. Activator Control of Nucleosome Occupancy in Activation and Repression of Transcription. *PLoS Biol.* 6(12):e317.

**Bryant G.O., Ptashne M.** 2003. Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell.* 5:1301-9.

**Cabal G.G., Genovesio A., Rodríguez-Navarro S., Zimmer C., Gadal O., Lesne A., Buc H., Feuerbach-Fournier F., Olivo-Marin J.C., Hurt E.C., Nehrbass U.** 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature.* 441(7094):770-3.

**Cairns B.R., Lorch Y., Li Y., Zhang M., Lacomis L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Du J., Laurent B., Kornberg R.D.** 1996. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell.* 87(7):1249-60.

**Cao Y., Cairns B.R., Kornberg R.D., Laurent B.C.** 1997. Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 17(6):3323-34.

**Carey M., Kakidani H., Leatherwood J., Mostashari F., Ptashne M.** 1989. An amino-terminal fragment of *GAL4* binds DNA as a dimer. *Mol Biol.* 209(3):423-32.

**Carrozza M.J., Li B., Florens L., Suganuma T., Swanson S.K., Lee K.K., Shia W.J., Anderson S., Yates J., Washburn M.P., Workman J.L.** 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell.* 123(4):581-92.

**Carvin C.D., Kladde M.P.** 2004. Effectors of lysine 4 methylation of histone H3 in *Saccharomyces cerevisiae* are negative regulators of *PHO5* and *GAL1-10*. *J Biol Chem.* 279(32):33057-62.

**Cavalli G., Thoma F.** 1993. Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* 12(12):4603-13.

**Clapier C.R., Cairns B.R.** 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* 78:273-304.

**Cosgrove M.S., Boeke J.D., Wolberger C.** 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol.* 11(11):1037-43.

**Côté J., Peterson C.L., Workman J.L.** 1998. Perturbation of nucleosome core structure by the *SWI/SNF* complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(9):4947-52.

**Côté J., Quinn J., Workman J.L., Peterson C.L.** 1994. Stimulation of *GAL4* derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast *SWI/SNF* complex. *Science.* 265(5168):53-60.

- Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A.** 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol.* 145(6):1119-31.
- De Vit M.J., Waddle J.A., Johnston M.** 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell.* 8(8):1603-18.
- Deckert J., Struhl K.** 2002. Targeted Recruitment of Rpd3 Histone Deacetylase Represses Transcription by Inhibiting Recruitment of Swi/Snf, SAGA, and TATA Binding Protein. *Mol Cell Biol.* 22(18):6458-70.
- Fedor M.J., Lue N.F., Kornberg R.D.** 1988. Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream activating sequence in yeast. *J Mol Biol.* 204(1):109-27.
- Floer M., Wang X., Prabhu V., Berrozpe G., Narayan S., Spagna D., Alvarez D., Kendall J., Krasnitz A., Stepansky A., Hicks J., Bryant G.O., Ptashne M.** 2010. A RSC/nucleosome complex determines chromatin architecture and facilitates activator binding. *Cell.* 141(3):407-18.
- Fraser P., Bickmore W.A.** 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature.* 447(7143):413-7.
- Frey P.A.** 1996. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10(4):461-70.
- Fukasawa T., Obonai K., Segawa T., Nogi Y.** 1980. The enzymes of the galactose cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Purification and characterization of uridine diphosphoglucose 4-epimerase. *J Biol Chem.* 255(7):2705-7.
- Gilbert N., Gilchrist S., Bickmore W.A.** 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol.* 242:283-336.
- Giniger E., Ptashne M.** 1988. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(2):382-86.
- Graham I.R., Chambers A.** 1994. A Reb1p-binding site is required for efficient activation of the yeast *RAP1* gene, but multiple binding sites for Rap1p are not essential. *Mol Microbiol.* 2(6):931-40.
- Grant P.A., Duggan L., Côté J., Roberts S.M., Brownell J.E., Candau R., Ohba R., Owen-Hughes T., Allis C.D., Winston F., Berger S.L., Workman J.L.** 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11(13):1640-50.
- Green E.M., Jiang Y., Joyner R., Weis K.** 2012. A negative feedback loop at the nuclear periphery regulates *GAL* gene expression. *Mol Biol Cell.* (7):1367-75.

- Guarente L., Yocum R.R., Gifford P.** 1982. *GAL10-CYC1* hybrid yeast promoter identifies-the *GAL4* regulatory region as an upstream site. *Genetics*. 79:7410-14.
- Hassan A.H., Neely K.E., Workman J.L.** 2001. Histone acetyltransferase complexes stabilize Swi/Snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*. 104(6):817-27.
- Henderson P.J.** 1993. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr Opin Cell Biol*. 5(4):708-21.
- Hopper J.E., Rowe L.B.** 1978. Molecular Expression and Regulation of the Galactose Pathway Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 253 20):7566-69.
- Horak J., Wolf D.H.** 1997. Catabolite Inactivation of the Galactose Transporter in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Ubiquitination, Endocytosis, and Degradation in the Vacuole. *J Bacteriol*. 179(5):1541-9.
- Houseley J., Rubbi L., Grunstein M., Tollervey D., Vogelauer M.** 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast *GAL* gene cluster. *Mol Cell*. 32(5):685-95.
- Christacos N.C., Marson M.J., Wells L., Riehm K., Fridovich-Keil J.L.** 2000. Subcellular localization of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Metab*. 70(4):272-80.
- Jansen A., Verstrepen K.J.** 2011. Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 75 (2):301-320.
- Jiang, F., Frey B.R., Evans M.L., Friel J.C., Hopper J.E.** 2009. Gene activation by dissociation of an inhibitor from a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol*. 29(20):5604-10.
- Johnston M.** 1987. A model for *GAL* gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 51(4):458-76.
- Johnston M., Davis R.W.** 1984. Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 4(8):1440-48.
- Joshi A.A., Struhl K.** 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell*. 20(6):971-8.
- Ju Q.D., Morrow B.E., Warner J.R.** 1990. *REB1*, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essential for growth and bears some resemblance to the oncogene myb. *Mol Cell Biol*. 10(10):5226-34.
- Kadosh D., Struhl K.** 1998 a. Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes & Dev*. 12(6):797-805.

- Kadosh D., Struhl K.** 1998 b. Targeted recruitment of the Sin3–Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol.* 18(9):5121–27.
- Kavanaugh L.A., Dietrich F.S.** 2009. Non-Coding RNA Prediction and Verification in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 5(1):e1000321.
- Keleher C.A., Redd M.J., Schultz J., Carlson M., Johnson A.D.** 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell.* 68(4):709-19.
- Keogh M.C., Kurdistani S.K., Morris S.A., Ahn S.H., Podolny V., Collins S.R., Schuldiner M., Chin K., Punna T., Thompson N.J., Boone C., Emili A., Weissman J.S., Hughes T.R., Strahl B.D., Grunstein M., Greenblatt J.F., Buratowski S., Krogan N.J.** 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell.* 123(4):593-605.
- Kouzarides T.** 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4):693-705.
- Kruckeberg A.L., Bisson L.F.** 1990. The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol Cell Bio.* 10(11):5903-13.
- Laughon A., Gesteland F.R.** 1982. Isolation and preliminary characterization of the *GAL4* gene, a positive regulator of transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(22):6827–31.
- Laughon A., Gesteland R.F.** 1984. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Mol Cell Biol.* 4(2):260–7.
- Lohr D.** 1997. Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes. *J Biol Chem.* 272(43):26795-8.
- Lohr D., Lopez J.** 1995. *GAL4/GAL80*-dependent nucleosome disruption/deposition on the upstream regions of the yeast *GAL1-10* and *GAL80* genes. *J Biol Chem.* 270(46):27671-8.
- Lohr D., Venkov P., Zlatanova J.** 1995. Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* 9(9):777-87.
- Ma J., Ptashne M.** 1987. Deletion analysis of *GAL4* defines two transcriptional activating segments. *Cell.* 48(5):847-53.
- Mattick J.S., Makunin I.V.** 2006. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 15(1):R17-29.
- Melcher K., Johnston S.A.** 1995. *GAL4* interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol.* 15(5):2839–48.
- Melcher K., Xu E.** 2001. Gal80–Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete *GAL* gene repression. *EMBO J.* 20(4):841–51.

- Mendjan S., Taipale M., Kind J., Holz H., Gebhardt P., Schelder M., Vermeulen M., Buscaino A., Duncan K., Mueller J., Wilm M., Stunnenberg H.G., Saumweber H., Akhtar A.** 2006. Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell*. 21(6):811–23.
- Meyer J., Walker-Jonah A., Hollenberg C.P.** 1991. Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 11(11):5454–61.
- Morrow B.E., Johnson S.P., Warner J.R.** 1989. Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *J Biol Chem*. 264(15):9061–8.
- Morrow B.E., Ju Q., Warner J.R.** 1990. December Purification and characterization of the yeast rDNA binding protein *REB1*. *J Biol Chem*. 265(34):20778–83.
- Nehlin J.O., Carlberg M., Ronne H.** 1991. Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J*. 10(11):3373–7.
- Nishizawa K., Shimoda E., Kasahara M.** 1995. Substrate recognition domain of the Gal2 galactose transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by chimeric galactose-glucose transporters. *J Biol Chem*. 270(6):2423–6.
- Oh D., Hopper J.E.** 1990. Transcription of a yeast phosphoglucomutase isozyme gene is galactose inducible and glucose repressible. *Mol Cell Biol*. 10(4):1415–22.
- Packham E.A., Graham I.R., Chambers A.** 1996. The multifunctional transcription factors Abf1p, Rap1p and Reb1p are required for full transcriptional activation of the chromosomal *PGK* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 250(3):348–56.
- Parthun M.R., Jaehning J.A.** 1992. A transcriptionally active form of *GAL4* is phosphorylated and associated with *GAL80*. *Mol Cell Biol*. 12(11):4981–7.
- Peng G., Hopper J.E.** 2000. Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 20(14):5140–8.
- Peng G., Hopper J.E.** 2002. Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(13):8548–53.
- Pilauri V., Bewley M., Diep C., Hopper J.** 2005. Gal80 Dimerization and the yeast *GAL* gene switch. *Genetics*. 169(4):1903–14.
- Pinskaya M., Gourvennec S., Morillon A.** 2009. H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *EMBO J*. 28(12):1697–707.

- Platt A., Reece R.J.** 1998. The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J.* 17(14):4086–91.
- Platt A., Ross H.C., Hankin S., Reece R.J.** 2000. The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3154-9.
- Ramos J., Cirillo V.P.** 1989. Role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in catabolite inactivation of the glucose and galactose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 171(6):3545–48.
- Ramos J., Szkutnicka K., Cirillo V.P.** 1989. Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles. *J Bacteriol.* 171(6):3539-44.
- Rando O.J., Winston F.** 2012. Chromatin and Transcription in Yeast. *Genetics.* 190(2):351-87.
- Riehman K., Crews C., Fridovich-Keil J.L.** 2001. Relationship between genotype, activity, and galactose sensitivity in yeast expressing patient alleles of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem.* 276(14):10634-40.
- Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J., Antúnez O., Brettschneider S., Lechner J., Pérez-Ortín J.E., Reed R., Hurt E.** 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 116(1):75-86.
- Samanta M.P., Tongprasit W., Sethi H., Chin C., Stolc V.** 2006. Global identification of noncoding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating an essential RNA processing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11):4192–7.
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A.J., Sherriff J., Bernstein B.E., Emre T.C.N., Schreiber S.L., Mellor J., Kouzarides T.** 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419(6905):407-11.
- Seiboth B., Hofmann G., Kubicek C.P.** 2002. Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the gal7 gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol Genet Genomics.* 267(1):124-32.
- Sellick C.A., Reece R.J.** 2005. Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem Sci.* 30(7):405-12.
- Sharma V.M., Tomar R.S., Dempsey A.E., Reese J.C.** 2007. Histone Deacetylases RPD3 and HOS2 Regulate the Transcriptional Activation of DNA Damage-Inducible Genes. *Mol Cel Biol.* 27(8):3199 -210.

- Shimada H., Fukasawa T.** 1985. Controlled transcription of the yeast regulatory gene *GAL80*. *Gene*. 39(1):1-9.
- Schaft D., Roguev A., Kotovic K.M., Shevchenko A., Sarov M., Shevchenko A., Neugebauer K.M., Stewart A.F.** 2003. The histone 3 lysine 36 methyltransferase, *SET2*, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic Acids Res.* 31(10):2475-82.
- Schell M.A., Wilson D.B.** 1977. Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 252(4):1162-6.
- Sil A.K., Alam S., Xin P., Ma L., Morgan M., Lebo C.M., Woods M.P., Hopper J.E.** 1999. The Gal3p-Gal80p-Gal4p Transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Mol Cell Biol*. 19(11):7828-40.
- Steinmetz E.J., Warren C.L., Kuehner J.N., Panbehi B., Ansari A.Z., Brow D.A.** 2006. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol Cell*. 24(5):735-46.
- Strahl B.D., Grant P.A., Briggs S.D., Wen Sun Z., Bone J.R., Caldwell JA., Mollah S., Cook G.R., Shabanowitz J., Hunt D.F, Allis C.D.** 2002. Set2 Is a Nucleosomal Histone H3-Selective Methyltransferase That Mediates Transcriptional Repression. *Mol Cell Biol*. 22(5):1298-1306.
- Suzuki-Fujimoto T., Fukuma M., Yano K.I., Sakurai H., Vonika A., Johnston S.A., Fukasawa T.** 1996. Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol Cell Biol*. 16(5):2504-8.
- Timson D.J., Reece R.J.** 2002. Kinetic analysis of yeast galactokinase: implications for transcriptional activation of the *GAL* genes. *Biochimie*. 84(4):265-72.
- Timson D.J., Ross H.C., Reece R.J.** 2002. Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *Biochem J*. 363(3):515-20.
- Torchia T.E., Hopper J.E.** 1986. Genetic and molecular analysis of the *GAL3* gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 113(2):229-46.
- Treitel M.A., Kuchin S., Carlson M.** 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 18(11):6273-80.
- Tzamarias D., Struhl K.** 1995. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially. *Genes Dev*. 9:821-31
- Vaquerizas J.M., Suyama D., Kind J., Miura K., Luscombe N.M., Akhtar A.** 2010. Nuclear pore proteins nup153 and megator define transcriptionally active regions in the *Drosophila* genome. *PLoS Genet*. 6(2):e1000846.



- Webster T.D., Dickson R.C.** 1988. The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* 16(16):8011–28.
- Wu P.Y., Ruhlmann C., Winston F., Schultz P.** 2004. Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell.* 15(2):199-208.
- Xiao T., Hall H., Kizer K.O., Shibata Y., Hall M.C., Borchers C.H., Strahl B.D.** 2003. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev.* 17(5):654–63.
- Zenke F.T., Engles R., Vollenbroich V., Meyer J., Hollenberg C.P., Breunig K.D.** 1996. Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science.* 272(5268):1662-5.
- Zhang Y., Reinberg D.** 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15(18):2343-60.